



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PREPARACIÓN DE CÁLCULOS RENALES ARTIFICIALES INFECTADOS

Armando Luna, Achim M. Loske, Ulises M. Álvarez, Luz María López Marín, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Juriquilla, Querétaro, C.P. 76230. armandolunasuarez@gmail.com

Palabras clave: litotricia extracorpórea, endotoxinas, cálculos artificiales.

Introducción. La litotricia extracorpórea por ondas de choque se lleva a cabo en pacientes con urolitiasis. Entre el 1 y el 2% de los pacientes en tratamiento presentan complicaciones por el ingreso de endotoxinas al torrente sanguíneo (choque anafiláctico)(1). Esto sucede porque, al lisar las bacterias contenidas en los cálculos, se liberan grandes cantidades de lipopolisacárido (LPS), también llamados endotoxinas. Actualmente se sabe poco sobre la forma en que las endotoxinas son liberadas durante el tratamiento de litotricia. Para abordar este problema resulta atractivo el disponer de sistemas capaces para modelar, *in vitro*, el proceso de liberación de endotoxinas a partir de cálculos infectados. El propósito de este trabajo es utilizar un modelo de cálculos infectados previamente reportado (2) para explorar las condiciones y metodologías que permitan su utilización para simular, *in vitro*, procesos de liberación de endotoxinas durante tratamientos con ondas de choque.

Metodología. Los cálculos artificiales fueron preparados con dos diferentes composiciones químicas: sulfato de calcio dihidratado (yeso) y fosfato de amonio y magnesio hidratado (estruvita). Se usó *Escherichia coli* para infectar los modelos. La preparación se fraguó en moldes de 1 cm de diámetro con yeso, Velmix y la bacteria en suspensión. Los cálculos fueron sometidos a cavitación acústica por ondas de choque en un generador piezoeléctrico. El método montado para analizar el contenido de endotoxinas liberado consistió en la extracción de lípidos, lavado de Folch y procesamiento para cuantificar ácidos grasos 3-hidroxiados, biomarcadores específicos de LPS (3). El método seleccionado para este análisis fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto electrónico debido a su alta sensibilidad. Para el montaje del método se emplearon alícuotas de diluciones seriadas a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial. La carga bacteriana fue determinada por conteo de unidades formadoras de colonia (ufc).

Resultados. Los análisis por espectrometría de masas de los derivados de ácidos grasos mostraron un perfil complejo, por lo que los biomarcadores fueron analizados en espectros obtenidos por monitoreo de iones selectos (SIM) (Fig. 1). Para explorar el uso de este método analítico en cálculos artificiales infectados, el crecimiento

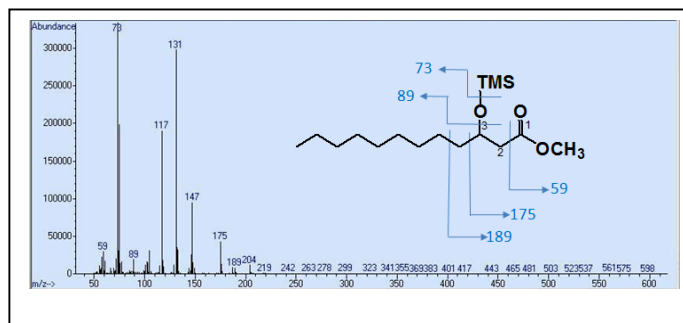


Fig 1. Espectro de masas del derivado de un ácido graso 3-OH, biomarcador de endotoxinas.

bacteriano fue analizado en sobrenadantes de cálculos pulverizados manualmente. Estos ensayos mostraron que el crecimiento de *E. coli* resulta altamente comprometido a partir de las 2 horas de incubación dentro del cálculo.

Conclusiones. El empleo de cromatografía de gases-espectrometría de masas con monitoreo de iones selectos (GC-SIM-MS) resulta adecuado para detectar ácidos grasos 3-OH, biomarcadores de endotoxinas. El uso de estándares de LPS, así como de un estándar interno serán necesarios para realizar el análisis de manera cuantitativa. Los resultados encontrados con la infección de cálculos artificiales indican que otros parámetros microbianos deben ser considerados para realizar estudios *in vitro* de la dinámica de dispersión de endotoxinas durante tratamientos de litotricia por ondas de choque. En particular, exploramos la capacidad de la cepa utilizada para aclimatarse en medios ricos en sulfato de calcio. Futuros análisis serán considerados para determinar las características básicas del inóculo idóneo para este tipo de pruebas.

Bibliografía.

1. Loske AM, Álvarez UM, Hernández-Galicia C, Castaño-Tostado E, Prieto FE (2002). Bactericidal effect of underwater shock waves *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3. 321-327.
2. Van Deventer SW, Aarden L, Hack E, Sturk A. Endotoxin induced biological effects, the role of cytokines (1988). In: van Deventer SJH (ed) *Endotoxins in the pathogenesis of gram-negative septicemia*. Katwijk Albedon- Klop, Amsterdam, 113-127.
3. Binding, N., Jaschinski, S., Werlich, S., Bletz, S., Witting, U. (2004) Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. *J. Environ. Monit.* 6: 65-70.